

В. И. СУРОВЦЕВ, Л. В. КОЗЛОВ, В. К. АНТОНОВ

СВОЙСТВА ХИМОТРИПСИНА, КОВАЛЕНТНО СВЯЗАННОГО С КАРБОКСИМЕТИЛЦЕЛЛЮЛОЗОЙ

(Представлено академиком М. М. Шемякиным 27 II 1970)

Настоящая работа посвящена выяснению возможности эффективной стабилизации α -химотрипсина (КФ 3.4.4.5) при ковалентном связывании его с нерастворимым полимерным носителем (¹). α -Химотрипсин содержит 17 свободных аминогрупп — 3 N-концевых аминокислоты и 14 лизиновых остатков, что создает возможность образования амидных связей между аминогруппами фермента и карбоксильными группами носителя. В качестве носителя была выбрана карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ). Решающую роль при выборе этого носителя сыграли три его свойства: наличие карбоксильных групп для образования ковалентных связей с белками, нерастворимость и природный характер матрицы, исключающей сильные гидрофобные взаимодействия с белковой молекулой, которые могли бы привести к денатурации последней.

КМЦ-химотрипсин получали методом, аналогичным описанному ранее (^{2, 3}). КМЦ (карбоксиметилцеллюлоза 70, Ватман, емкость — 0,7 экв/г) этерифицировали обработкой метиловым спиртом, содержащим HCl, затем получали гидразид, который переводили в азид. 1,5 г азид КМЦ суспендировали в 60 мл 0,05 M боратного буфера pH 8,7 при 2° и добавляли 0,6 г α -химотрипсина (высокоочищенный препарат завода медицинских препаратов Ленинградского мясокомбината им. С. М. Кирова), растворенного в 60 мл охлажденного буфера. Перемешивали 1 час при 2°, центрифугировали, осадок промывали охлажденными растворами: 250 мл 0,001 M HCl, 250 мл воды, 500 мл 1 M NaCl, 180 мл 0,5 M NaHCO₃, 180 мл 1 M NaCl и 180 мл воды. Продукт лиофильно высушивали. Выход 1,5 г. Чтобы убедиться в том, что полученный препарат содержал только ковалентно связанный химотрипсин и не содержал адсорбированного фермента, 0,5 г КМЦ-химотрипсина промывали 2 раза 30 мл 0,001 M HCl, 30 мл 1 M NaCl, 2 раза 30 мл 0,5 M NaHCO₃, доведенного до pH 9,5, 30 мл 1 M NaCl и водой. Дополнительная промывка препарата не приводила к изменению активности КМЦ-химотрипсина. Препарат КМЦ-химотрипсина подвергали полному гидролизу 5,7 M HCl при 105° в течение 48 час. и по количеству лизина в гидролизате оценивали содержание белка в препарате.

Ферментативные свойства полученного препарата были охарактеризованы определением активности по белковым субстратам: гемоглобину (⁴) и казеину (⁵), титрованием активных центров *n*-нитрофенилацетатом с использованием полярографической методики, описанной нами ранее (⁶) и исследованием гидролиза этилового эфира *N*-ацетил-*L*-тирозина (АТЭЭ) на pH-стате. Получены следующие данные содержания химотрипсина в препарате КМЦ-химотрипсина:

	Амино- кислотный анализ	Титрова- ние актив- ных центров	Гидролиз АТЭЭ	Гидролиз гемоглоби- на	Гидролиз казеина
pH	—	5,8	8,8	7,6	7,6
Колич. фермента, мг на 1 г препа- рата	112	28	30	30	35

Определение активности КМЦ-химотрипсина по АТЭЭ проводили путем сравнения скорости гидролиза при pH 8,8 (оптимум для КМЦ-химотрипсина) со скоростью гидролиза этого субстрата химотрипсином при pH 7,85 (оптимум для химотрипсина). Смещение оптимума pH в щелочную область для КМЦ-химотрипсина (рис. 1), наблюдавшееся и в работе (3), можно объяснить тем, что карбоксильные группы КМЦ создают влия-

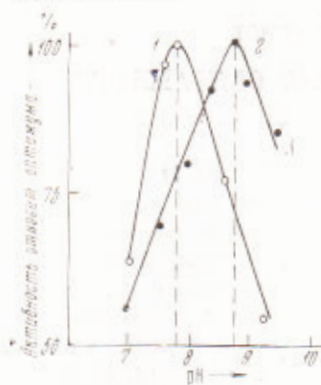


Рис. 1. Зависимость активности химотрипсина (I) и КМЦ-химотрипсина (II) от pH. Субстрат — АТЭЭ

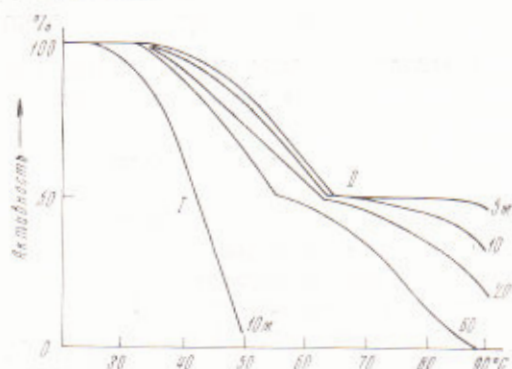


Рис. 2. Зависимость устойчивости химотрипсина (I) и КМЦ-химотрипсина (II) от температуры. На графиках обозначена продолжительность инкубации в минутах

зи активного центра фермента окружение, в котором локальная концентрация протонов несколько выше (см., например, (7)), чем в растворе.

Определение активности КМЦ-химотрипсина разными методами дало хорошо согласующиеся результаты. Были определены также константы $k_{кат}$ и $K_M(наж)$ для гидролиза АТЭЭ химотрипсином и КМЦ-химотрипсином при оптимальных значениях pH:

	Химотрипсин	КМЦ-химотрипсин
$k_{кат}, \text{сек}^{-1}$	151	151
$K_M(наж), M$	$7,3 \cdot 10^{-4}$	$9,9 \cdot 10^{-4}$
pH	7,85	8,80

Модифицирование химотрипсина не меняет его каталитических свойств.

Препараты КМЦ-химотрипсина, описанные в литературе (2, 3), имели активность по белковым субстратам ниже их эстеразной активности. В работе (2), а также в аналогичном случае с препаратом КМЦ-фицина (7) авторы объясняли пониженную протеолитическую активность нерастворимых производных ферментов пространственными затруднениями. Особенностью полученного нами препарата является столь же высокая его активность по белковым субстратам — гемоглобину и казеину, как и по АТЭЭ. Это объясняется, по-видимому, использованием КМЦ с большей степенью замещения (а следовательно и более набухающей), чем в работе (2), что обеспечило доступность фермента крупным молекулам субстрата.

В процессе получения препарата КМЦ-химотрипсина часть фермента при связывании с носителем теряет свою активность (см. выше). Активность исходного белка не превышала 80%, так как исходный препарат содержал 80% по весу белка и 65% активного фермента. Расчет с учетом этих данных показывает, что около 30% фермента при связывании с носителем сохраняет свою активность.

Для решения вопроса, происходит ли эффективная стабилизация фермента при ковалентном связывании с нерастворимым полимерным носителем, мы решили сравнить устойчивость свободного химотрипсина и КМЦ-химотрипсина к температурным воздействиям. Ранее термостабильность КМЦ-химотрипсина, по-видимому, не изучалась. Сравнивая опти-

мальные температуры гидролиза *n*-нитроанилида *N*-бензоил-*L*-тирозина химотрипсином и КМЦ-химотрипсином, приведенных в работе ⁽³⁾, можно прийти к заключению, что препарат КМЦ-химотрипсина, полученный Такаками и Андо, незначительно отличается по термостабильности от свободного химотрипсина.

Мы проводили тепловую денатурацию КМЦ-химотрипсина при pH 7,35 в 0,02 *M* фосфатном буфере при температуре от 45 до 90°. Результаты приведены в виде графика на рис. 2. Характер кривых падения активности от температуры свидетельствует о повышенной термостабильности по сравнению с химотрипсином и о неоднородности препарата КМЦ-химотрипсина. Заметно сравнительно быстрое падение активности КМЦ-химотрипсина на 50% и медленное понижение остающихся 50% активности. Таким образом, полученный препарат состоит, по-видимому, из двух равных по количеству фракций: лабильной и стабильной. Название «лабильная», конечно, условно, поскольку даже «лабильная» фракция значительно термостабильнее свободного химотрипсина (см. рис. 2).

Повышение термостабильности химотрипсина объясняется, по-видимому, ковалентным его связыванием с носителем и нековалентными взаимодействиями с матрицей носителя. Из 17 свободных аминогрупп в молекуле нативного химотрипсина доступны 10—14, что зависит от реакционной способности используемого реагента ^(8, 9). Кроме того, свободная аминогруппа изолейцина-16 осуществляет ионное взаимодействие с β -карбоксильной группой остатка аспарагиновой кислоты-194, что необходимо для поддержания нативной конформации фермента ⁽¹⁰⁾. Блокирование этой аминогруппы приводит к инаktivации химотрипсина. Связанный белок в полученном препарате КМЦ-химотрипсина представляет собой 70% неактивного химотрипсина и 30% активного, из которого 15% — составляет лабильную и 15% — стабильную фракции. Инаktivация на 70% могла произойти в ходе связывания фермента как за счет ацилирования изолейцина-16, так и вследствие многоточечного ковалентного связывания или взаимодействия с матрицей, приводящих к изменению нативной конформации химотрипсина. Лабильная фракция, вероятно, образуется при малой степени ацилирования химотрипсина (возможно, при односточечном ковалентном связывании белка), ионные связи которого с карбоксильными группами матрицы повышают жесткость и термостабильность молекулы по сравнению со свободным химотрипсином в растворе. Стабильная фракция образуется при многоточечном (может быть даже только двухточечном) ковалентном связывании белка, которое, наряду с ионными связями, существенно повышает жесткость белковой глобулы. Вопросы конформационного закрепления молекулы белка и силы, стабилизирующие его молекулу при сорбции на носителе, нами исследуются.

Институт химии природных соединений
Академии наук СССР
Москва

Поступило
24 II 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ I. H. Silman, E. Katchalski, Ann. Rev. Biochem., 35, 873 (1966). ² M. A. Mitz, L. J. Summaria, Nature, 189, 576 (1961). ³ T. Takami, T. Ando, Seikagaku, 40, 749 (1968). ⁴ M. L. Anson, J. Gen. Physiol., 22, 79 (1938). ⁵ M. Kunitz, J. Gen. Physiol., 30, 291 (1947). ⁶ Л. В. Козлов, П. Н. Смирнов и др., ДАН, 180, 1492 (1968). ⁷ W. E. Hornby, M. D. Lilly, E. M. Crook, Biochem. J., 98, 420 (1966). ⁸ A. Matsushima, Y. Hachimori et al., J. Biochem. (Tokyo), 61, 328 (1967). ⁹ K. Nakaya, H. Horinishi, K. Shibata, J. Biochem. (Tokyo), 61, 337 (1967). ¹⁰ B. W. Matthews, P. B. Sigler et al., Nature, 214, 652 (1967).